

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



525601



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. März 2004 (25.03.2004)

PCT

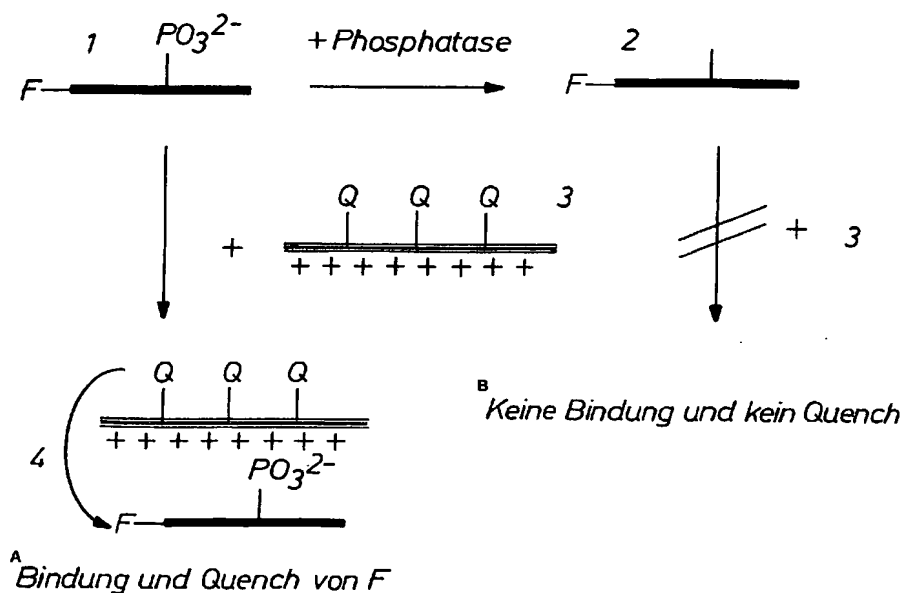
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/024946 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/37, 1/42, 1/48, 1/68, G01N 33/542
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009121
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
18. August 2003 (18.08.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 39 005.3 26. August 2002 (26.08.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAYER HEALTHCARE AG [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MEYER-ALMES, Franz-Josef [DE/DE]; Dürerstr. 39, 58636 Iserlohn (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER HEALTHCARE AG; Law and Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: HOMOGENEOUS FLUORESCENCE ASSAY FOR KINASES, PHOSPHATASES, AND PHOSPHODIESTERASES

(54) Bezeichnung: HOMOGENER FLUORESCENZ-ASSAY FÜR KINASEN, PHOSPHATASEN UND PHOSPHODIESTERASEN



(57) Abstract: The invention relates to a homogeneous assay method for quantitatively measuring kinase, phosphatase, and phosphodiesterase (PDE) reactions. The inventive method can be applied in a direct assay format and a competitive assay format.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/024946 A1

**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent

(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Homogene Fluoreszenz-Assay-Methode für Kinasen, Phosphatasen und Phosphodiesterasen**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine homogene Assay-Methode zur quantitativen Messung von Kinase-, Phosphatase- und Phosphodiesterase(PDE)-reaktionen. Die Methode kann sowohl in einem direkten, als auch in einem kompetitiven Assay-format angewendet werden.
- 10 Protein-(De-)Phosphorylierung ist ein allgemeiner regulatorischer Mechanismus, mit dem Zellen selektiv Proteine modifizieren, die regulatorische Signale von außen in den Zellkern vermitteln. Die Proteine, die diese biochemischen Modifikationen ausführen gehören zur Gruppe der Kinasen bzw. Phosphatasen. Phosphodiesterasen hydrolysieren den sekundären Botenstoff cAMP bzw. cGMP und nehmen auf diese
- 15 Weise ebenfalls Einfluss auf zelluläre Signaltransduktionswege. Daher dienen diese Enzyme als hochinteressante Zielmoleküle der Pharma- und Pflanzenschutzforschung.
- 20 Traditionelle Methoden zur Messung des Phosphorylierungszustandes zellulärer Proteine basieren auf den Einbau von radioaktivem  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate. Die  $^{32}\text{P}$ -phosphorylierten Proteine werden auf einem Gel getrennt und anschließend mit einem Phospho-Imager sichtbar gemacht. Alternativ können phosphorylierte Tyrosinreste durch Bindung von radioaktiv markierten anti-Phosphotyrosin-Antikörpern gebunden und durch Immunoassays z.B. Immunoprecipitation oder Blotting,
- 25 nachgewiesen werden. Da diese Methoden radioaktive Isotopen nachweisen müssen, sind sie zeitaufwendig und auch aufgrund der Sicherheitsaspekte im Umgang mit radioaktiven Substanzen nicht für die Hochdurchsatz-Wirkstofffindung (uHTS, ultra high throughput screening) geeignet.
- 30 Neuere Methoden ersetzen die radioaktiven Immunoassays durch ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay). Diese Methoden verwenden aufgereinigte Substrat-

proteine oder synthetische Peptidsubstrate, die auf einer Substratoberfläche immobilisiert sind. Nach Einwirkung einer Kinase wird das Ausmaß der Phosphorylierung dadurch quantifiziert, indem anti-Phosphotyrosin-Antikörper, die mit einem Verstärkerenzym wie z.B. Peroxidasen gekoppelt sind, an die phosphorylierten immobilisierten Substrate binden.

Epps. et al. (US 6 203 994) beschreiben einen Fluoreszenz-basierten HTS-Assay für Protein Kinasen und Phosphatasen, der fluoreszenzmarkierte phosphorylierte Reportermoleküle und Antikörper, die spezifisch die phosphorylierten Reportermoleküle binden, verwendet. Die Bindung wird mittels Fluoreszenzpolarisation, Fluoreszenzquench oder Fluoreszenz Correlations Spektroskopie (FCS) gemessen. Dieses Verfahren hat den intrinsischen Nachteil, dass es nur gute generische Antikörper (z.B. clone PT66, PY20, Sigma) für Phosphotyrosin-Substrate gibt. Es werden nur wenige Beispiele von geeigneten anti-Phosphoserin- bzw. anti-Threonin-Antikörpern berichtet (z.B. Bader B. et al., Journal of Biomolecular Screening, 6, 255 (2001), Panvera-Kit No. P2886). Diese Antikörper haben aber die Eigenschaft, nicht nur Phosphoserin, sondern auch die benachbarten Aminosäuren als Epitop zu erkennen. Es ist aber bekannt, dass Kinasen sehr substratspezifisch arbeiten und sich die Substratsequenzen stark unterscheiden können. Daher sind anti-Phosphoserin-Antikörper nicht als generische Reagenzien einsetzbar.

Die Firma Perkin Elmer (Wallac) bietet für Tyrosin-Kinasen einen Assay an, der auf zeitaufgelöster Fluoreszenz und einem Energietransfer von Europium-Chelaten auf Allophycocyanin beruht (s. auch EP 929 810). Auch hier ist das Verfahren durch die Verwendung von Antikörpern im wesentlichen auf Tyrosin-Kinasen beschränkt.

Die Firma Molecular Devices bietet seit kurzem Nanopartikel mit geladenen Metall-Kationen auf der Oberfläche als generisches Bindungsreagenz an, dass für Phosphorylierungsreaktionen sowohl an Tyrosin, als auch an Serin und Threonin geeignet ist. Die Bindungsreaktion wird aber im stark sauren pH von ca. 5 und bei hoher Ionenstärke durchgeführt. Daher ist für die Bindung der Nanopartikel ein starker

Verdünnungsschritt der Reaktion in den Ziel-Puffer notwendig, was bei Assay-Gesamtvolumina von 10 µl im 1536-Format im uHTS problematisch ist. Die Messung der Bindung geschieht auch hier mittels Fluoreszenzpolarisation.

5 Nikorov schließlich führte polyionische Polymere als Bindungsreagenzien von Phosphorylierungsreaktionen ein. Er beschrieb poly-Aminosäuren wie z.B. poly-Histidin, poly-L-Lysin und poly-L-Arginin (US 6 287 774, Nikorov et al. Anal. Biochem. 278, 206-212 (2000)). Die Erfindung von Nikorov bezieht sich aber ausschließlich auf die Fluoreszenzpolarisation als Meßmethode, die relativ aufwendig ist  
10 und derzeit noch keine parallele Messung einer Mikrotiterplatte (MTP) erlaubt. Daher wären die Messzeiten für eine 1536-MTP sehr hoch und die parallele Messung von Enzymkinetiken nicht möglich. Außerdem ist die Fluoreszenzpolarisation als Methode auf sehr kleine fluoreszente Substrate beschränkt. Auch sind Polyethylenimine als Bindungsreagenzien nicht explizit erwähnt.

15 In der vorliegenden Erfindung wird die Limitation der Beschränkung auf (De)Phosphorylierungsreaktionen am Tyrosin von US 6 203 994 durch die Verwendung von polykationischen Polymeren anstelle von Antikörpern, aufgebrochen. Dadurch wird die Messung von allen Kinase- und Phosphatasereaktionen an Serin,  
20 Threonin und Tyrosin sowie auch die Messung von Phosphodiesterasereaktionen möglich. Während Nikorov (US 6 287 774) mittels Fluoreszenzpolarisation nach dem gegenwärtigen Stand der Technik nicht parallel eine Mikrotiterplatte mit 96, 384 oder gar 1536 Proben messen kann, eröffnet meine Erfindung aufgrund der simplen Messtechnik die parallele Messung sogar von hochzeitaufgelösten Enzymkinetiken.  
25 Darüber hinaus ermöglichen Messungen der Fluoreszenzintensität gegenüber der Fluoreszenzpolarisation eine größere Sensitivität bei kürzeren Messzeiten.

Als weiterer Vorteil gegenüber Nikorov kann das wesentlich billigere und hydrolysestabilere Polyethylenimin verwendet werden

**Beschreibung der Erfindung:**

In der vorliegenden Erfindung werden polykationische Polymere mit fluoreszenz-  
quenchenden Eigenschaften verwendet, um Kinase-, Phosphatase- und Phospho-  
diesterasereaktionen zu messen. Die Assay-Methode beinhaltet keine Waschschr-  
5 und ist perfekt auch für miniaturisierte Assays in Gesamtvolumina von 10 µl und  
weniger geeignet. Das polykationische Polymer, das als universelles und generisches  
Bindungsreagenz für Moleküle mit mindestens einer einfach gebundenen  
Phosphatgruppe dient, kann unmodifiziert oder markiert mit Quencher-Farbstoffen  
10 wie z.B. Dabcyl oder QSY35 eingesetzt werden.

Das direkte Assayformat besteht im wesentlichen aus folgenden Schritten:

- 15 i) Ein fluoreszentes Edukt wird durch eine Kinase-, Phosphatase- oder PDE-  
Reaktion in ein fluoreszentes Produkt umgewandelt, das sich durch min-  
destens eine einfach gebundene Phosphatgruppe vom Edukt unterscheidet.
- ii) Ein polykationisches Polymer, das Quenchergruppen enthält, wird (vor,  
während oder nach der Reaktion) zugegeben und bindet entweder das phos-  
phorylierte fluoreszente Edukt oder das phosphorylierte fluoreszente Produkt.  
20 Dabei wird die Fluoreszenz des phosphorylierten Eduktes bzw. des phos-  
phorylierten Produktes durch die Quenchergruppen auf dem polykationischen  
Polymer gequencht.
- iii) Der Reaktionsumsatz wird durch Messung der Fluoreszenzintensität und/oder  
der Fluoreszenzlebenszeit quantifiziert. Wenn die Zugabe des polykat-  
25 ionischen Polymers vor oder während der Reaktion geschieht, kann die  
Kinetik der Reaktion verfolgt werden.

Das kompetitive Assayformat besteht aus folgenden Schritten:

- 30 i) Ein nicht-fluoreszentes Edukt wird durch eine Kinase-, Phosphatase- oder  
PDE-Reaktion in ein nicht-fluoreszentes Produkt umgewandelt, das sich

durch mindestens eine einfach gebundene Phosphatgruppe vom Edukt unterscheidet.

- 5           ii) Ein polykationisches Polymer, das Quenchergruppen enthält, und ein fluoreszentes, phosphoryliertes Reporterreagenz wird (vor, während oder nach der Reaktion) zugegeben. Es entsteht ein Komplex aus dem polykationischen Polymer und dem Reporterreagenz, wenn kein phosphoryliertes Edukt oder phosphoryliertes Produkt vorhanden sind. Dabei wird die Fluoreszenz des phosphorylierten Eduktes bzw. des phosphorylierten Produktes durch die Quenchergruppen auf dem polykationischen Polymer ge-
- 10           quencht. In Gegenwart von entweder phosphoryliertem Edukt oder phosphoryliertem Produkt kompetieren diese mit dem Reporterreagenz um die Bindung an das polykationische Polymer, wodurch der Quench der Fluoreszenz des Reporterreagenz aufgehoben wird.
- 15           iii) Der Reaktionsumsatz wird durch Messung der Fluoreszenzintensität und/oder der Fluoreszenzlebenszeit quantifiziert. Wenn die Zugabe des polykationischen Polymers und des fluoreszenten Reporterreagenz vor oder während der Reaktion geschieht, kann die Kinetik der Reaktion verfolgt werden.

20           **Phosphatase-Assays** werden so konfiguriert, dass ein fluoreszentes phosphoryliertes Substrat-Peptid oder -Protein (1) zunächst von einer Phosphatase dephosphoryliert wird. Im Anschluss an die Reaktion wird das polyionische Polymer (3) hinzugegeben. Ist das Enzym aktiv, so bindet das polyionische Polymer nicht an das fluoreszente dephosphorylierte Substrat (2) und die Fluoreszenz ist ungequencht hoch. Ist das Enzym inaktiv oder inhibiert, so bindet das polyionische Polymer an das

25           fluoreszente phosphorylierte Substrat und quencht die Fluoreszenz des Substrates (Komplex, 4) (s. Abb. 1).

30           **Kinase-Assays** können entweder direkt oder kompetitiv aufgebaut werden. Beim direkten Kinase-Assay wird ein nicht phosphoryliertes fluoreszentes Substrat-Peptid oder -Protein eingesetzt, dass mindestens ein Serin oder ein Threonin oder ein Tyrosin enthält. Das polyionische Polymer kann gleich zu Beginn der Reaktion oder

erst nach der Reaktion hinzugegeben werden. Ist die Kinase aktiv, so wird das Substrat phosphoryliert und vom polyionischen Polymer gebunden, wobei die Fluoreszenz des Substrates gequencht wird. Ist die Kinase inhibiert oder inaktiv, so bleibt die Fluoreszenz des Substrates hoch (s. Abb. 2). In einem kompetitiven Kinase-Assay wird neben einem nicht fluoreszentem Substrat-Peptid oder -Protein (5) ein fluoreszentes phosphoryliertes Peptid od. Protein (Reporterreagenz, 7) eingesetzt, das von dem polyionischen Polymer gebunden wird wobei die Fluoreszenz des Reporterreagenz gequencht wird. Das Polymer kann zu Beginn oder nach der Enzymreaktion zugesetzt werden. In dem Maße, wie das Substrat phosphoryliert wird (6), konkurriert es zunehmend mit dem Reporterreagenz um die Bindung an das polyionische Polymer (Komplex, 8). Folglich wird immer weniger Reporterreagenz von dem polyionischen Polymer gebunden und die Fluoreszenz des Reporterreagenz weniger gequencht (s. Abb. 3).

Ähnlich wie Kinase-Assays können auch **Phosphodiesterase-Assays** direkt oder kompetitiv konfiguriert werden. Im direkten Modus wird ein fluoreszentes cAMP- oder cGMP-Derivat (9) verwendet, das von dem polyionischen Polymer nicht gebunden wird. Es findet dann kein Quench der Fluoreszenz statt. Sobald die zyklischen Nukleotid-Derivate hydrolysiert werden und damit eine einfach gebundene Phosphatgruppe entsteht, bindet das polyionische Polymer das entstandene fluoreszente Nukleotidmonophosphat (10) und quencht dessen Fluoreszenz (Komplex, 11) (s. Abb. 4). Im kompetitiven Modus wird analog zum kompetitiven Kinase-Assay ein fluoreszentes phosphoryliertes Reporterreagenz (7) und nicht fluoreszente cAMP- bzw. cGMP-Derivate (12) eingesetzt. Ist die Phosphodiesterase aktiv, so entsteht Nukleotidmonophosphat (13), das mit dem Reporterreagenz um die Bindung an das polyionische Polymer konkurriert, d.h. die Fluoreszenz des Reporterreagenz wird nicht mehr gequencht. Ist das Enzym inhibiert oder inaktiv, so bindet das polyionische Polymer an das Reporterreagenz und quencht dessen Fluoreszenz (s. Abb. 5).

30

Das Messprinzip in allen vorgestellten Assayvarianten beruht auf dem Quenchen der



Fluoreszenz eines Substrates oder eines Reporterreagenz. Der Mechanismus des Fluoreszenzquenches kann z.B. ein Förster-Energietransfer auf einen nicht fluoreszierenden Farbstoff sein. Dadurch wird auch die Fluoreszenzlebenszeit beeinflusst, so dass die Bindung des polyionischen Polymers an das fluoreszente Substrat bzw. Reporterreagenz auch mittels Messung der Fluoreszenzlebensdauer gemessen werden kann. Eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer kann auch dann gemessen werden, wenn der Fluorophor F sich genügend nahe an der phosphorylierten Aminosäure befindet, an der das polyionische Polymer bindet. In diesem Fall ist es nicht notwendig, dass das Polymer mit Quencherfarbstoffen markiert ist.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine homogene Assay-Methode für Kinasen, Phosphatasen und Phosphodiesterasen durch direkte Unterscheidung von Edukten und Produkten der Kinase-, Phosphatase- und Phosphodiesterasereaktionen bestehend aus folgenden Schritten:

15

- a) Das Substrat von Kinasereaktionen besteht aus einem fluoreszentem Peptid bzw. einem fluoreszentem Protein, das mindestens ein Serin oder mindestens ein Threonin oder mindestens ein Tyrosin enthalten muss, das von der Kinase phosphoryliert werden kann.

20

Das Substrat von Phosphatasereaktionen besteht aus einem fluoreszentem Peptid bzw. einem fluoreszentem Protein, das mindestens ein phosphoryliertes Serin oder mindestens ein phosphoryliertes Threonin oder mindestens ein phosphoryliertes Tyrosin enthalten muss, das von der Phosphatase dephosphoryliert werden kann.

25

Das Substrat einer Phosphodiesterase ist ein fluoreszentes cAMP- oder cGMP-Derivat, das durch die Phosphodiesterase in das entsprechende AMP- bzw. GMP-Derivat mit freier Phosphatgruppe überführt wird.

30

- b) Durch Zugabe von unmodifizierten oder mit Quencherfarbstoffen modi-

fizierten polykationischen Polymeren, die selektiv das Edukt oder das Produkt der Enzymreaktion, das mindestens eine einfach gebundene Phosphatgruppe enthält, binden und dabei die Fluoreszenz des gebundenen Eduktes oder Produktes quenchen, wird zwischen Edukt und Produkt von Kinase-,  
5 Phosphatase- und Phosphodiesterasereaktionen unterschieden.

c) Die Bindung der polykationischen Polymere kann durch Fluoreszenzmessungen detektiert werden.

10 Alternativ: können die Kinase- und Phosphodiesterase-Assays auch kompetitiv konfiguriert werden:

Das Substrat von Kinasereaktionen besteht aus einem nicht fluoreszentem Peptid bzw. einem nicht fluoreszentem Protein, das mindestens ein Serin oder mindestens  
15 ein Threonin oder mindestens ein Tyrosin enthalten muss, das von der Kinase phosphoryliert werden kann.

Das Substrat einer Phosphodiesterase ist ein nicht fluoreszentes cAMP- oder cGMP-Derivat, das durch die Phosphodiesterase in das entsprechende AMP- bzw. GMP-Derivat mit freier Phosphatgruppe überführt wird.  
20

Zusätzlich wird ein mindestens einfach phosphoryliertes fluoreszentes Peptid bzw. Protein (Reporterreagenz) hinzugegeben, an das das polykationische Polymer bindet.

25 Durch Zugabe von unmodifizierten oder mit Quencherfarbstoffen modifizierten polykationischen Polymeren wird das Reporterreagenz gebunden und dessen Fluoreszenz gequencht. In dem Maße, wie durch die Kinase- bzw. Phosphodiesterasereaktion Produkt entsteht, das mindestens eine einfach gebundene Phosphatgruppe enthält, konkurriert dieses phosphorylierte Produkt mit dem Reporterreagenz um die Bindung  
30 an das polykationische Polymer. Dadurch wird die Bindung des Reporterreagenz an das polykationische Polymer aufgehoben und die Fluoreszenz des Reporterreagenz

steigt wieder auf den ungequenchten Wert.

Die Bindung der polykationischen Polymere kann durch Fluoreszenzmessungen detektiert werden.

**Beispiele:**

- 1) Darstellung des Konjugates aus Dabcyl und Polyethylenimin (PEI880-Dabcyl):

5

Material: Polyethylenimin (PEI880), Fluka No. 03880, MW ca. 600-1000 kDa  
4-((4-(Dimethylamino)phenyl)azo)benzoesäure-succinimidylester  
(Dabcyl-SE),  
Molecular Probes, No. D-2245  
NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma, No's 6329, 6392  
Hydroxylamin-Hydrochlorid,  
10 M NaOH  
Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, No. 41640  
Sephadex G-25 NAP-10 Säulen, Pharmacia

10

15

Durchf.: Carbonat-Puffer pH 9.0, 1M:

10 ml 1M NaHCO<sub>3</sub>  
+ 2.5 ml 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

20

Kopplung von Dabcyl an PEI880:

100 µl 0.15 g/ml PEI880, pH 7.0  
+100 µl 1M Carbonat-Puffer pH 9.0  
+600 µl H<sub>2</sub>O  
+200 µl Dabcyl-SE-Lösung 10 mg/ml in DMSO (frisch gelöst)

25

Der Reaktionsmix wird 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 100 µl 1.5 M Hydroxylamin pH 8.5 und 1-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln gestoppt. Anschließend wird das PEI880-Dabcyl-Konjugat von überschüssigem Dabcyl-Farbstoff durch Gelfiltration auf einer NAP-10-Säule abgetrennt.

30

Ergebnis: Die erste orange Bande der chromatographischen Aufreinigung stellte das Produkt, Dabcyl-markiertes PEI880 dar. Überschüssiges und desaktiviertes ..... ???

5 Ebenfalls oranger Dabcyl-Farbstoff blieb auf der Säule zurück.

2) Ionenstärkeinfluss auf die Bindung eines Phosphoserin-Peptides an PEI880-Dabcyl

10 Material: Fluorescein-(GRPRTpSSFAEG) (Tracer), Panvera, Kit No. P2886  
PEI880-Dabcyl-Konjugat

Durchf.: Je 10 nM Tracer und 0.6  $\mu$ M PEI880-Dabcyl-Konjugat wurden in HEPES-Puffer pH 7.5 in Gegenwart von 0, 150 mM und 1 M NaCl  
15 jeweils mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden mit einem Igel-Pipettierer (Cybio) auf 1536-Mikrotiterplatten pipettiert. In einem Tecan Ultra wurde abschließend die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenz-  
20 polarisation simultan gemessen.

Ergebnis: Ohne NaCl wurde die Fluoreszenz des Tracers gequencht, bei höherer Ionenstärke fand kein Quench statt. Messungen der Fluoreszenz-  
polarisation zeigten nur bei 150 mM und 1 M NaCl keine Erhöhung, was gleichzeitig belegte, dass unter den Bedingungen keine Bindung  
25 zwischen Tracer und Polymer stattfand. Das ist ein Beleg für den ionischen Charakter der Bindung.

3) Bindung eines fluoreszenten Phosphotyrosin-Peptides an PEI880-Dabcyl:

30 Material: Fluorescein-C6-TEGQpYQPQP (Fl-P1), Synthese Eurogentec  
PEI880-Dabcyl-Konjugat

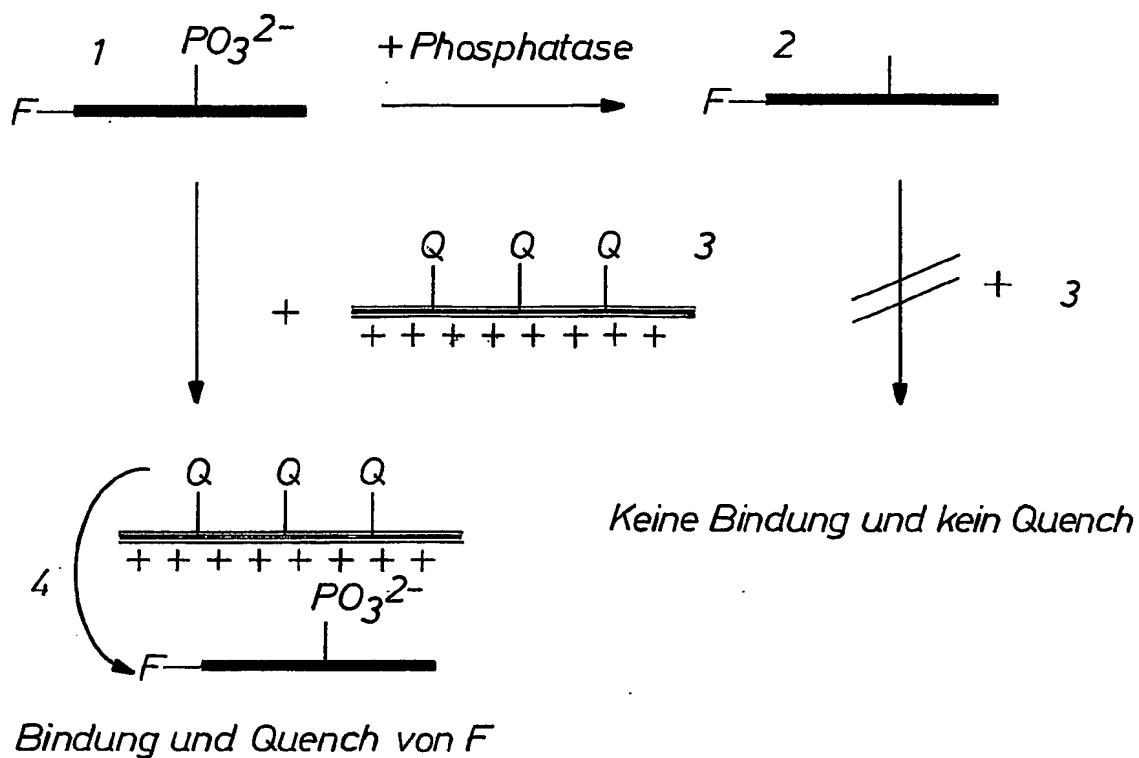
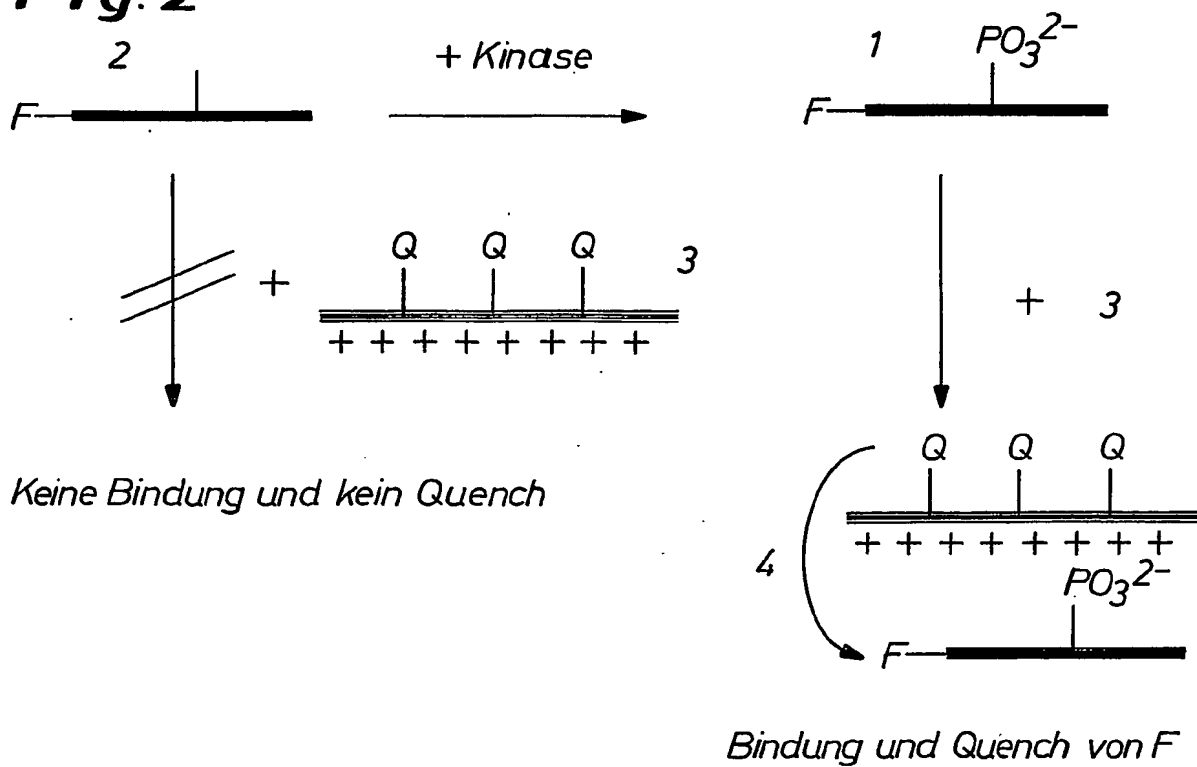
- 5      **Durchf.:**      Je 10 nM Fl-P1 wurden in Gegenwart von 150 mM NaCl in 50 mM HEPES-Puffer pH 7.5 mit PEI880-Dabcyl-Konzentrationen von 10 pM bis 120  $\mu$ M jeweils mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden mit einem Igel-Pipettierer (Cybio) auf 1536-Mikrotiterplatten pipettiert. In einem Tecan Ultra wurde abschließend die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzpolarisation simultan gemessen.
- 10      **Ergebnis:**      Auch das Phosphotyrosin-Peptid Fl-P1 wird von PEI880-Dabcyl gebunden. Wie beim Phosphoserin-Peptid (Bsp. 2) steigt bei Bindung die Polarisierung an, während gleichzeitig die Fluoreszenz von Fl-P1 gequencht wird.

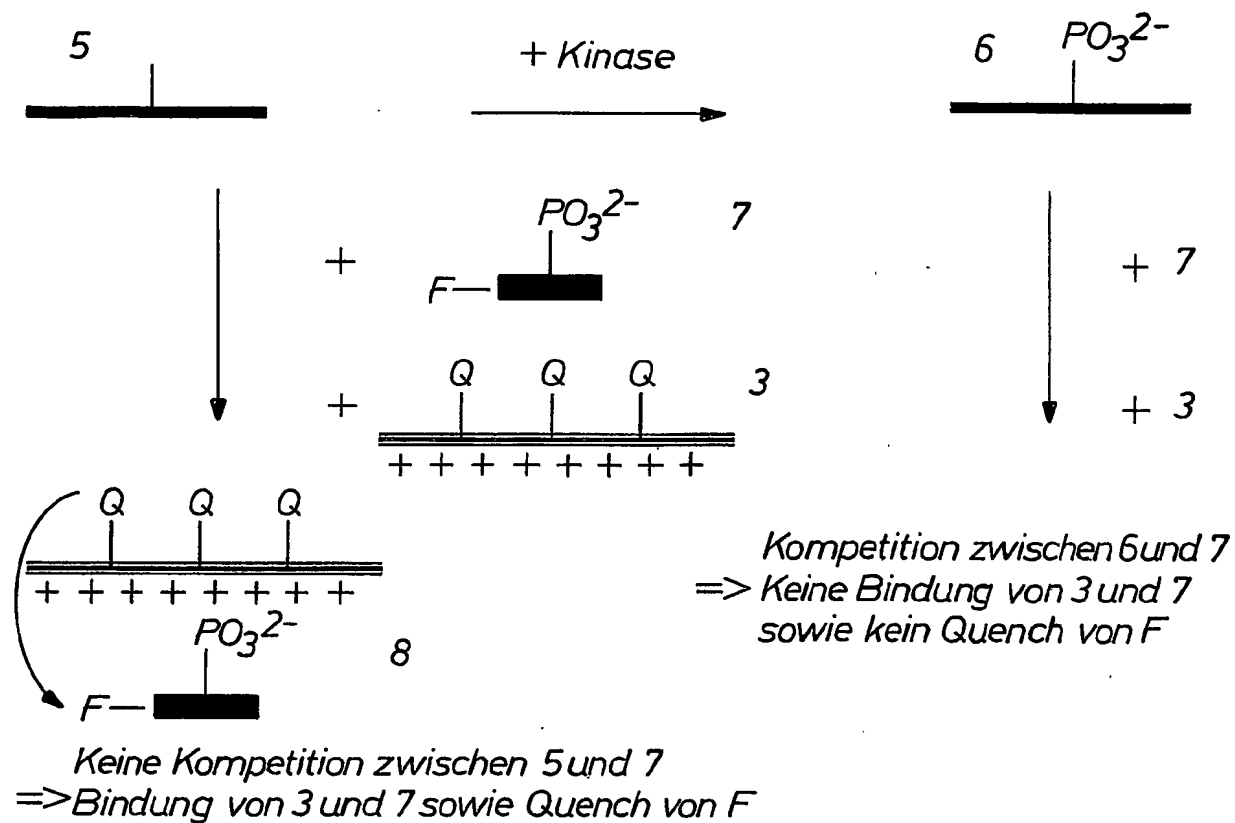
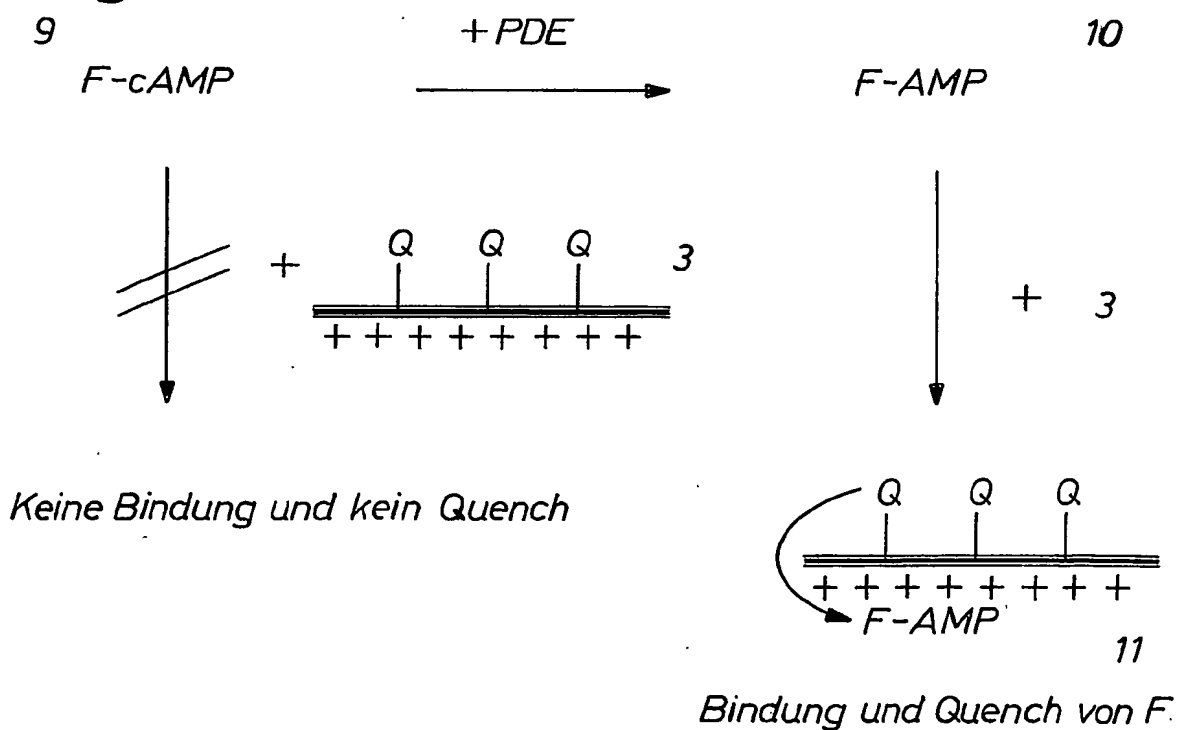
**Patentansprüche**

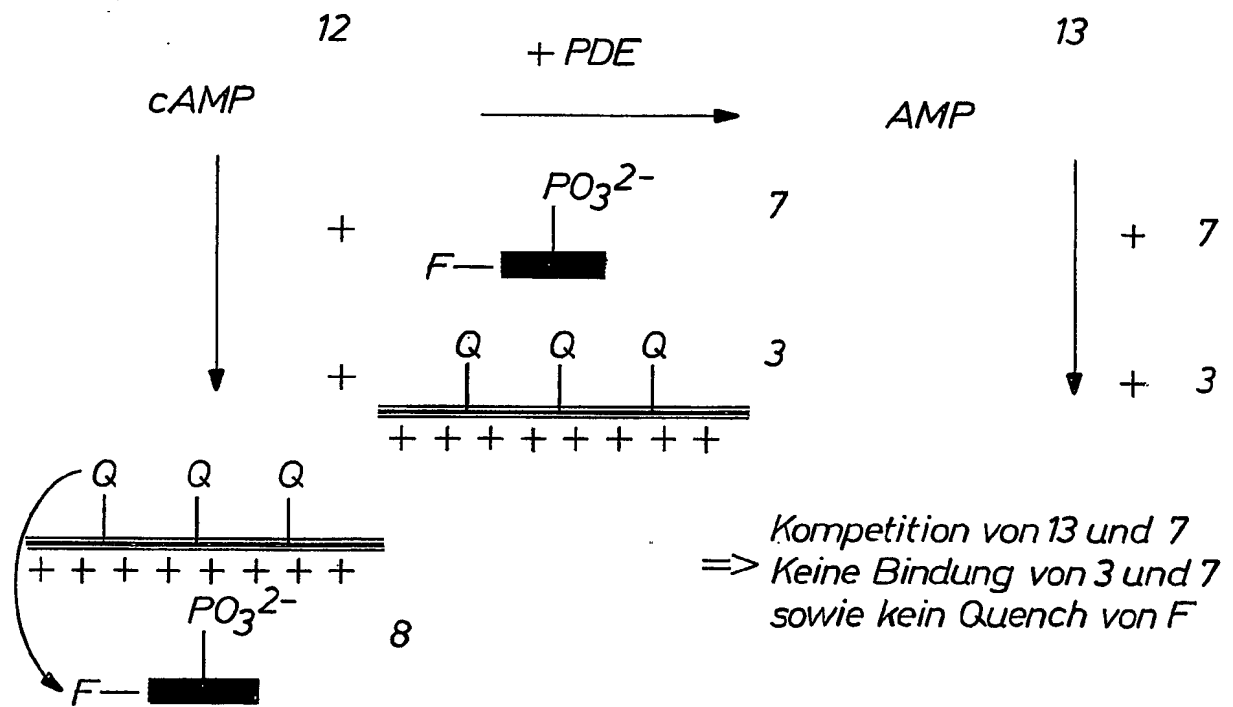
1. Homogene Assay-Methode zur quantitativen Messung von Kinase-, Phosphatase- und Phosphodiesterase(PDE)-reaktionen, dadurch gekennzeichnet,  
5 dass man die Kinase, Phosphatase oder Phosphodiesterase mit einem fluoreszenten, phosphorylierbaren oder dephosphorylierbaren Substrat in Anwesenheit eines polykationischen Polymers, das Quenchergruppen enthält, reagieren lässt und die Veränderung der Phosphorylierung durch die Änderung der Fluoreszenz bestimmt.
- 10 2. Assay Methode nach Anspruch 1 wobei das polykationische Polymere Polyethylenimine, Polyarginine, Polylysine und/oder Polyhistidine ist.
3. Assay Methode nach Anspruch 1 wobei der Quencher Dabcyl, QSY35 oder  
15 ein anderer zum Energietransfer geeigneter Farbstoffe ist, der nicht selbst fluoresziert.
4. Assay Methode nach Anspruch 1 wobei der Fluoreszenz-Label Fluorescein, EDANS, Rhodamine, Cy5, EvoBlue-Farbstoffe, Coumarine und/oder Alexa-  
20 Farbstoffe ist.
5. Assay Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 4 wobei die Messung kinetisch erfolgt.
- 25 6. Assay Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 4 wobei die Messung in einer Mikrotiterplatte parallel/simultan erfolgt.
7. Assay Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 6 wobei die Änderung der Fluoreszenz entweder die Änderung der Fluoreszenzintensität oder die  
30 Änderung der Fluoreszenzlebenszeit ist.

8. Assay Methode nach einem der Ansprüche 1 bis 7 wobei die Messung zur Auffindung von Wirkstoffen verwendet wird, die die untersuchte Kinase-, Phosphatase- oder Phosphodiesterase-Reaktion beeinflussen.



**Fig. 1****Fig. 2**

**Fig. 3****Fig. 4**

**Fig. 5**

Keine Konkurrenz zwischen 12 und 7  
 ⇒ Bindung von 3 und 7 sowie Quench von F

Kompetition von 13 und 7  
 ⇒ Keine Bindung von 3 und 7  
 sowie kein Quench von F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/09121

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/37 C12Q1/42 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/542

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/076697 A1 (NIKIFOROV THEO T) 20 June 2002 (2002-06-20)	1,2,5-8
Y	page 1, column 2, paragraph 4 -page 2, column 2, paragraph 2; claims 1-62; figures 3,4	3,4
X	US 6 287 774 B1 (NIKIFOROV THEO T) 11 September 2001 (2001-09-11) cited in the application claims 1-56; figures 1-4	1-8
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 December 2003

Date of mailing of the international search report

22/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stachowiak, O

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/09121

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COFFIN JILL ET AL: "Detection of phosphopeptides by fluorescence polarization in the presence of cationic polyamino acids: Application to kinase assays" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 278, 15 February 2000 (2000-02-15), pages 206-212, XP002150327 ISSN: 0003-2697 cited in the application abstract	1-8
Y	US 5 506 115 A (TOTH MIHALY V ET AL) 9 April 1996 (1996-04-09) abstract	3,4
A	LEVINE L M ET AL: "Measurement of specific protease activity utilizing fluorescence polarization" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 247, no. 1, 1997, pages 83-88, XP002228468 ISSN: 0003-2697 the whole document	1-8
A	DE 197 03 025 A (LORENZ BERND DR ;MUELLER WERNER E G PROF DR (DE); SCHROEDER HEINZ) 30 July 1998 (1998-07-30) examples 1,2	1-8
A	US 6 203 994 B1 (EPPS DENNIS E ET AL) 20 March 2001 (2001-03-20) cited in the application claims 1-33	1-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 03/09121

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002076697	A1	20-06-2002	US 6287774 B1	11-09-2001
			US 2002197619 A1	26-12-2002
			US 6436646 B1	20-08-2002
			AU 762155 B2	19-06-2003
			AU 5134300 A	12-12-2000
			CA 2373747 A1	30-11-2000
			CN 1355884 T	26-06-2002
			EP 1183536 A1	06-03-2002
			JP 2003502620 T	21-01-2003
			NZ 515384 A	29-08-2003
			WO 0072016 A1	30-11-2000
			US 2003175815 A1	18-09-2003
			US 2002146703 A1	10-10-2002
			ZA 200109192 A	07-11-2002
US 6287774	B1	11-09-2001	AU 762155 B2	19-06-2003
			AU 5134300 A	12-12-2000
			CA 2373747 A1	30-11-2000
			CN 1355884 T	26-06-2002
			EP 1183536 A1	06-03-2002
			JP 2003502620 T	21-01-2003
			NZ 515384 A	29-08-2003
			WO 0072016 A1	30-11-2000
			US 2002197619 A1	26-12-2002
			US 2003175815 A1	18-09-2003
			US 2002076697 A1	20-06-2002
			US 6436646 B1	20-08-2002
			US 2002146703 A1	10-10-2002
			ZA 200109192 A	07-11-2002
US 5506115	A	09-04-1996	US 5708137 A	13-01-1998
DE 19703025	A	30-07-1998	DE 19703025 A1	30-07-1998
US 6203994	B1	20-03-2001	US 2001044117 A1	22-11-2001
			AT 233325 T	15-03-2003
			AU 738194 B2	13-09-2001
			AU 1703499 A	28-06-1999
			CA 2306686 A1	17-06-1999
			DE 69811724 D1	03-04-2003
			DE 69811724 T2	16-10-2003
			DK 1036192 T3	10-06-2003
			EP 1036192 A1	20-09-2000
			JP 2001526380 T	18-12-2001
			PT 1036192 T	30-06-2003
			SI 1036192 T1	31-08-2003
			WO 9929894 A1	17-06-1999

# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen  
PCT/EP 03/09121

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/37 C12Q1/42 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/542

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2002/076697 A1 (NIKIFOROV THEO T) 20. Juni 2002 (2002-06-20)	1, 2, 5-8
Y	Seite 1, Spalte 2, Absatz 4 -Seite 2, Spalte 2, Absatz 2; Ansprüche 1-62; Abbildungen 3, 4	3, 4
X	US 6 287 774 B1 (NIKIFOROV THEO T) 11. September 2001 (2001-09-11) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-56; Abbildungen 1-4 ----- -/--	1-8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Dezember 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/12/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stachowiak, O

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	COFFIN JILL ET AL: "Detection of phosphopeptides by fluorescence polarization in the presence of cationic polyamino acids: Application to kinase assays" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 278, 15. Februar 2000 (2000-02-15), Seiten 206-212, XP002150327 ISSN: 0003-2697 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1-8
Y	US 5 506 115 A (TOTH MIHALY V ET AL) 9. April 1996 (1996-04-09) Zusammenfassung	3,4
A	LEVINE L M ET AL: "Measurement of specific protease activity utilizing fluorescence polarization" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 247, Nr. 1, 1997, Seiten 83-88, XP002228468 ISSN: 0003-2697 das ganze Dokument	1-8
A	DE 197 03 025 A (LORENZ BERND DR ;MUELLER WERNER E G PROF DR (DE); SCHROEDER HEINZ) 30. Juli 1998 (1998-07-30) Beispiele 1,2	1-8
A	US 6 203 994 B1 (EPPS DENNIS E ET AL) 20. März 2001 (2001-03-20) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-33	1-8



# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung und zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 03/09121

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2002076697 A1	20-06-2002	US 6287774 B1	11-09-2001
		US 2002197619 A1	26-12-2002
		US 6436646 B1	20-08-2002
		AU 762155 B2	19-06-2003
		AU 5134300 A	12-12-2000
		CA 2373747 A1	30-11-2000
		CN 1355884 T	26-06-2002
		EP 1183536 A1	06-03-2002
		JP 2003502620 T	21-01-2003
		NZ 515384 A	29-08-2003
		WO 0072016 A1	30-11-2000
		US 2003175815 A1	18-09-2003
		US 2002146703 A1	10-10-2002
		ZA 200109192 A	07-11-2002
US 6287774 B1	11-09-2001	AU 762155 B2	19-06-2003
		AU 5134300 A	12-12-2000
		CA 2373747 A1	30-11-2000
		CN 1355884 T	26-06-2002
		EP 1183536 A1	06-03-2002
		JP 2003502620 T	21-01-2003
		NZ 515384 A	29-08-2003
		WO 0072016 A1	30-11-2000
		US 2002197619 A1	26-12-2002
		US 2003175815 A1	18-09-2003
		US 2002076697 A1	20-06-2002
		US 6436646 B1	20-08-2002
		US 2002146703 A1	10-10-2002
		ZA 200109192 A	07-11-2002
US 5506115 A	09-04-1996	US 5708137 A	13-01-1998
DE 19703025 A	30-07-1998	DE 19703025 A1	30-07-1998
US 6203994 B1	20-03-2001	US 2001044117 A1	22-11-2001
		AT 233325 T	15-03-2003
		AU 738194 B2	13-09-2001
		AU 1703499 A	28-06-1999
		CA 2306686 A1	17-06-1999
		DE 69811724 D1	03-04-2003
		DE 69811724 T2	16-10-2003
		DK 1036192 T3	10-06-2003
		EP 1036192 A1	20-09-2000
		JP 2001526380 T	18-12-2001
		PT 1036192 T	30-06-2003
		SI 1036192 T1	31-08-2003
		WO 9929894 A1	17-06-1999